

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 39 39 200 A 1

⑯ Aktenzeichen: P 39 39 200.7
⑯ Anmeldetag: 27. 11. 89
⑯ Offenlegungstag: 29. 5. 91

⑯ Int. Cl.⁵:
C 12 N 1/00
C 12 N 1/21
C 07 K 13/00
C 12 N 15/09
C 12 P 21/02
C 12 P 21/08
G 01 N 33/569
// (C12N 1/20,
C12R 1:19)

DE 39 39 200 A 1

⑯ Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

⑯ Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000
München

⑯ Erfinder:

Kandolf, Reinhard, Dr., 8000 München, DE

⑯ Enterovirale Polypeptide und gruppenspezifischer Nachweis von Enterovirusinfektionen

Es wird ein Polypeptid beschrieben, das für die Gruppe der
Enteroviren spezifisch ist und zum Nachweis von Infektionen
mit diesen Viren eingesetzt werden kann.

DE 39 39 200 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Polypeptide, DNA-Sequenzen, welche für diese Polypeptide kodieren, die Verwendung dieser Polypeptide und einen gruppenspezifischen Test zum Nachweis von Enteroviren sowie enteroviralen Antikörpern.

5 In der klinischen Praxis spielt die Serodiagnose viraler Infektionen eine zentrale Rolle, die jedoch im Falle von Infektionen mit Enteroviren, welche die häufigste Ursache der viralen Myocarditis des Menschen darstellen, aufgrund der Vielzahl cardiotroper Enteroviren mit über 70 verschiedenen Serotypen ein bislang ungelöstes Problem darstellt. Die Enteroviren sind eine Gruppe von Viren, die zunächst den Respirations- oder Gastrointestinaltrakt infizieren, sich dort vermehren und sodann im Falle einer Virämie verschiedene Zielorgane infizieren, wie z. B. das Herz, das Pankreas, das zentrale Nervensystem oder das Rückenmark. Beispiele für diese Viren sind das Poliovirus, das Echovirus und das Coxsackie-Virus. Typische Erkrankungen nach Infektion mit solchen Viren sind Myocarditis, Pankreatitis und Meningitis. Die Enteroviren gehören zu der Gruppe der RNA-Viren.

10 Im Hinblick auf die Häufigkeit gerade von viralen Herzkrankungen kommt der Gruppe der Enteroviren eine sehr große klinische Bedeutung zu. Der Nachweis von Enterovirus-Infektionen als Ursache viraler Herzkrankheiten oder die prophylaktische Untersuchung bei Verdacht auf eine Enterovirus-Infektion machte bisher außerordentliche Schwierigkeiten. Eine spezifische Diagnose und damit eine Bestätigung eines klinischen Verdachts auf eine virale Herz-, oder andere Erkrankung nach Methoden des bisherigen Standes der Technik ist außerordentlich schwierig. Hierzu wurden bisher nämlich Hyperimmunseren eingesetzt, die gegen gereinigte 15 Viruspartikel einzelner Serotypen hergestellt wurden. Es war damit nur möglich, jeweils genau diejenigen Viren nachzuweisen, gegen die die Hyperimmunseren erzeugt worden waren. Da jedoch, wie bereits oben ausgeführt, über 70 verschiedene Serotypen cardiotroper Enteroviren existieren, war hierdurch ein umfassender Erreger-nachweis nicht möglich. Obwohl eine Reihe von antigenen Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Enteroviren 20 beschrieben wurde, war bislang eine Enterovirus-gruppenspezifische Serodiagnostik aufgrund der antigenen Heterogenität zwischen und innerhalb distinkter Serotypen überaus unbefriedigend bzw. nicht möglich. Zudem bestand bislang keine Möglichkeit zum Nachweis von Antikörpern gegen enterovirale RNA-Polymerasen.

25 Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, die Voraussetzungen für einen gruppenspezifischen Nachweis, der für die gesamte Familie der Enteroviren spezifisch ist, zu schaffen, anhand dessen die An- oder Abwesenheit dieser Viren sowie deren Antikörper im Blut oder Serum von Patienten bestimmbar ist.

30 Gelöst wird diese Aufgabe durch die erfindungsgemäßen Polypeptide, nämlich mit der Sequenz

MGAQVSTQ KTGAHETRLN ASGNSIIHYT NINYYKDAAS NSANRQDFTQ
 35 DPGKFTEPVK DIMIKSLPAL NSPTVEECGY SDRARSITLG NSTITTQECA
 NVVVGYGVWP DYLKDSEATA EDQPTQPDVA TCRFYTLDSV QWQKTSPGWW
 WKLKDALSNL GLFGQNMQYH YLGRTGYTVH VQCNAASKFHQ GCLLVCVPE
 40 AEMGCATLDN TPSSAELLGG DTAKEFADKP VASGSNKLVQ RVVYNAGMGV
 GVGNLTIFPH QWINLRTNNS ATIVMPYTNS VPMDNMFRHN NVTLMVIPFV
 PLDYCPGSTT YVPITVTIAP MCAEYNGLRL AGHQGLPTMN TPGSCQFLTS
 45 DDFQSPSAMP QYDVTPEMRI PGEVKNLMEI AEVDSVVPVQ NVGEKVNSME
 AYQIPVRSNE GSGTQVFGFP LQPGYSSVFS RTLLGEILNY YTHWSGSIKL

50

55

60

65

TFMFCGSAMA TGKFLLAYSP PGAGAPTKRV DAMLGTHVIW DVGLQSSCVL
 CIPWISQTHY RFVASDEYTA GGFITCWYQT NIVVPADAQS SCYIMCFVSA
 CNDFSVRLLK DTPFISQQNF FQGPVEDAIT AAIGRVADTV GTGPTNSEAI
 5
 PALTAAETGH TSQVPGDTM QTRHVKNYHS RSESTIENFL CRSACVYFTE
 YKNSGAKRYA EWVLTPRQAA QLRRKLEFFT YVRFDLELTF VITSTQQPST
 10
 TQNQDAQILT HQIMYVPPGG PVPDKVDSYV WQTSTNPSVF WTEGNAPPRM
 SIPFLSIGNA YSNFYDGWSE FSRNGVYGIN TLNNMGTLYA RHVNAGSTGP
 IKSTIRIYFK PKHVKAWIPIR PPRLCQYEKA KNVNFQPSGV TTRQSITTM
 15
 TNTGAFGQQS GAVYVGNYRV VNRHLATSAD WQNCVWESYN RDLLVSTTTA
 HGCDDIARCC QCTTGVYFCAS KNKHYPISFE GPGLVEVQES EYYPRRYQSH
 VLLAAGFSEP GDCGGILRCE HGVIGIVTMG GEGVVGFAIDI RDLLWLEDDA
 20
 MEQGVKDYVE QLGNAGSGF TNQICEQVNL LKESLVGQDS ILEKSLKALV
 KIISALVIVV RNHDDLITVT ATLALIGCTS SPWRWLKQKV SQYYGIPMAE
 RQNNSWLKKF TEMTNACKGM EWIAVKIQKF IEWLKVKILP EVREKHEFLN
 25
 RLKQLPLLES QIATIEQSAP SQSDQEQLFS NVQYFAHYCR KYAPLYAAEA
 KRVFSLEKKM SNYIQFKSKC RIEPVCLLH GSPGAGKSVA TNLIGRSLAE
 KLNSSVYSLP PDPPDHFDGYK QQAVVIMDDL CQNPDGKDVS LFCQMVSSVD
 30
 FVPPMAALEE KGILFTSPFV LASTNAGSIN APTVSDSRAL ARRFHFDMMI
 EVISMYSQNG KINMPMSVKT CDDECCPVNF KKCCPLVCGK AIQFIDRRTQ
 35
 VRYSLDMLVT EMFREYNHRH SVGTTLEALF QGPPVYREIK ISVAPETPPP
 PAIADLLKSV DSEAVREYCK EKGWLVPBIN STLQIEKHVS RAFICLQALT
 TFVSVAGIIY IIYKLFAGFQ GAYTGVPNQK PRVPTLRQAK VQGPAFEFAV
 40
 AMMKRNSSTV KTEYGEFTML GIYDRWAVLP RHAKPGPTIL MNDQEVGVLD
 AKELVDKDGT NLELTLKLN RNEKFRDIRG FLAKEEEVN EAVLAINTSK
 FPNMYIPVGQ VTEYGFNLG GTPTKRMILMY NFPTRAGQCG GVLMSTGKVL
 45
 GIHVGGNCHQ GFSALLKHY FNDEQGEIEF IESSKDAGFP VINTPSKTKL
 EPSVFHQVFE GNKEPAVLRG GDPRILKANFE EAIFSKYIGN VNTHVDEYML
 EAVDHAGQL ATLDISTEPM KLEDAVYGTE GLEALDLTT AGYPYVALGI
 KKRDLISKKT KDLTKLKECM DKYGLNLPMV TYVKDELRSI EKVAKGKSRL
 50
 IEASSLNDSV AMRQTFGNLY KTFHLPNGVV TGSAGVCDPD LFWSKIPVML
 DGHЛИAFDYS GYDASLSPVW FACLKMLLEK LGYTHKETNY IDYLCNSHHL
 YRDKHYFVRG GMPSGCSGTS IFNSMINNII IRTLMLKVKYK GIDLDQFRMI
 AYGDDVIASY PWPIDASLLA EAGKGYGLIM TPADKGECKN EVTWTNATFL
 55
 KRYFRADEQY PFLVHPVMPM KDIHESIRWT KDPKNTQDHV RSLCLLAWHN
 GEHEYEEFIR KIRSVPGRC LTLPAFSTLR RKWLDSF
 60
 65

bzw. den bevorzugten Polypeptiden, deren Teilsequenzen von Aminosäure 3 bis 448 (VP4/2/3, Aminosäure 516 bis 952 (VP1) oder Aminosäure 1769 bis 2129 (Polymerase) in den Ansprüchen 2 bis 4 angegeben sind. Die erfindungsgemäß bevorzugten Polypeptide stellen distinkte, bakteriell synthetisierte virale Strukturproteine,

(VP4/2/3 bzw. VP1); sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase von Coxsackie-Virus B3 dar.

Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, daß vor allem die viralen Strukturproteine VP4/2/3 und VP1, aber auch die Polymerase zur Bildung von Antikörpern führen, welche für die gesamte Gruppe der Enteroviren spezifisch sind. Es ist nämlich erfindungsgemäß erstmals gelungen, Polypeptide mit antigenen 5 Eigenschaften ausfindig zu machen, die offensichtlich allen der über 70 Serotypen von Enteroviren gemeinsam sind.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sind Polypeptide, die wenigstens eine der auf den erfindungsgemäßen Polypeptiden vorhandene antigene Determinante aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante DNA, welche einlignet in einen geeigneten 10 Expressionsvektor, eine DNA-Sequenz enthält, die für ein erfindungsgemäßes Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert. Als Expressionsvektor sind hierbei alle für die Expression in Wirtszellen geeigneten Moleküle verwendbar, wie Plasmide, Cosmide, Phagengenome in ihrer doppelsträngigen (RF)-Form und andere. Die Auswahl des richtigen Vektormoleküls ist hierbei von der Auswahl zur Expression zu verwendender Wirtszellen abhängig und dem Fachmann geläufig.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die rekombinante DNA die folgende Sequenz:

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 39 39 200 A1

1 UUAAAACAGC CUGUGGGUUG AUCCCACCCA CAGGCCAUU GGGCGCUAGC
 51 ACUCUGGUAU CACGGUACCU UUGUGGCCU GUUUUAUACC CCCUCCCCA
 101 ACUGUAACUU AGAAGUAACA CACACCGAUC AACAGUCAGC GUGGCACACC 5
 151 AGCCACGUUU UGAUCAAGCA CUUCUGUUAC CCCGGACUGA GUAUCAAUAG
 201 ACUGCUCACG CGGUUGAAGG AGAAAGCGUU CGUUAUCCGG CCAACUACUU
 251 CGAAAAACCU AGUAACACCG UGGAAGUUGC AGAGUGUUUC GCUCAGCACU 10
 301 ACCCCAGUGU AGAUCAGGUC GAUGAGUCAC CGCAUUCCCC ACGGGCGACC
 351 GUGGCCGUGG CUGCGUUGGC GGCCUGCCCA UGGGGAAACC CAUGGGACGC
 401 UCUAAUACAG ACAUGGUGCG AAGAGUCUAU UGAGCUAGUU GGUAGUCCUC 15
 451 CGGCCCUUGA AUGCGGUAAA UCCUAACUGC GGAGCACACA CCCUCAAGCC
 501 AGAGGGCAGU GUGUCGUAC GGGCAACUCU GCAGCGGAAC CGACUACUUU
 551 GGGUGUCCGU GUUUCAUUUU AUUCCUAUAC UGGCUGCUUA UGGUGACAAU 20
 601 UGAGAGAUCC UUACCAUAAA GCUAUUGGAU UGGCCAUCCG GUGACUAAUA
 651 GAGCUAUUAU AUAUCCUUU GUUGGGUUAU UACCACUUAG CUUGAAAGAG 25
 701 GUUAAAACAU UACAAUUCAU UGUUAAGUUG AAUACAGCAA AAUGGGAGCU
 751 CAAGUAUCAA CGCAAAAGAC UGGGGCACAU GAGACCAGGC UGAAUGCUAG
 801 CGGCAAUUCC AUCAUUCACU ACACAAAUU UAAUUAUUC AAGGAUGCCG 30
 851 CAUCCAACUC AGCCAAUCGG CAGGAUUUCA CUCAAGACCC GGGCAAGUUC
 901 ACAGAACCCAG UGAAAGAUAU CAUGAUUAAA UCACUACCCAG CUCUCAACUC
 951 CCCCACAGUA GAGGAGUGCC GAUACAGUGA CAGGGCGAGA UCAAUCACAU 35
 1001 UAGGUAAUCU CACCAUAACG ACUCAGGAAU GCGCCAACGU GGUGGGUGGC
 1051 UAUGGAGUAU GGCCAGAUUA UCUAAAGGAU AGUGAGGCAA CAGCAGAGGA 40
 1101 CCAACCGGACC CAACCAGACG UUGCCACAU UAGGUUCUAU ACCCUUGACU
 1151 CUGUGCAAUG GCAGAAAACC UCACCAGGAU GGUGGGUGGAA GCUGCCGGAU
 1201 GCUUJUGUCGA ACUUAGGACU GUUJGGCAG AACAUCCAGU ACCACUACUU
 1251 AGGCCGAACU GGGUAUACCC UACAUUGCA GUGCAAUGCA UCUAAGUCC 45
 1301 ACCAAGGAUG CUUGCUAGUA GUGUGUAC CGGAAGCUGA GAUGGGUUGC
 1351 GCAACGCUAG ACAACACCCC AUCCAGUGCA GAAUUGCUGG GGGGCGAUAC
 1401 GCGAAAGGAG UUUGCGGACA AACCGGUCGC AUCCGGGUCC AACAAAGUUGG 50
 1451 UACAGAGGGU GGUGUAUAAU GCAGGCAUGG GGGUGGGUGU UGGAAACCUUC
 1501 ACCAUUUUCC CCCACCAAUG GAUCAACCUC CGCACCAAUA AUAGUGCUAC
 1551 AAUUGUGAUG CCAUACACCA ACAGUGUACC UAUGGAUAA AUGUUUAGGC 55
 1601 AUAACAACGU CACCCUAAUG GUUAUCCAU UUGUACCGCU AGAUUACUGC 60

DE 39 39 200 A1

1651 CCUGGGUCCA CCACGUACGU CCCAAUJUACG GUCACGAUAG CCCCCAAUGUG
 1701 UGCCGAGUAC AAUGGGUUAC GUUUAGCAGG GCACCAGGGC UUACCAACCA
 5 1751 UGAAUACUCC GGGGAGCUGU CAAUUUCUGA CAUCAGACGA CUUCCAAUCA
 1801 CCAUCCGCCA UGCCGCAAUA UGACGUCACA CCAGAGAUGA GGAAUACCUGG
 10 1851 UGAGGUGAAA AACUUGAUGG AAAUAGCUGA GGUUGACUCA GUUGUCCCCAG
 1901 UCCAAAUGU UGGAGAGAAG GUCAACUCUA UGGAAGCAUA CCAGAUACCU
 1951 GUGAGAUCCA ACGAAGGAUC UGGAACGCAA GUAUUCGGCU UUCCACUGCA
 15 2001 ACCAGGGUAC UCGAGUGUUU UUAGUCGGAC GCUCCUAGGA GAGAUCUUGA
 2051 ACUAUUAUAC ACAUUGGUCA CCCACCAUAA AGCUUACGUU UAUGUTUCUGU
 2101 GGUUCGGCCA UGGCUACUGG AAAAUUCCUU UUGGCAUACU CACCACCAGG
 2151 UGCUGGGAGCU CCUACAAAAA GGGUUGAUGC UAUGCUUGGU ACUCAUGUAA
 2201 UUUGGGACGU GGGGCUACAA UCAAGUUGCG UGCUGUGUAU ACCCUGGAUA
 2251 AGCCAAACAC ACUACCGGUU UGUUGCUUCA GAUGAGUUAU CCCAGGGGG
 2301 UUUUAUJUACG UGCUGGUAUC AAACAAACAU AGUGGUCCA GCGGAUGCCC
 2351 AAAGCUCCUG UUACAUCAUG UGUUUCGUGU CAGCAUGCAA UGACUUCUCA
 2401 GUCAGGCUAU UGAAGGACAC UCCUUJUCAUU UCGCAGCAA ACUUUUJUCCA
 30 2451 GGGCCCAGUG GAAGACGCCA UAACAGCCGC UAUAGGGAGA GUUGCCGAUA
 2501 CCGUGGGUAC AGGGCCAACC AACUCAGAAG CUAUACCAGC ACUCACUGCU
 2551 GCUGAGACGG GUCACACGUC ACAAGUAGUG CCGGGUGACA CUAUGCAGAC
 2601 ACGCCACGUU AAGAACUACC AUUCAAGGUC CGAGUCAACC AUAGAGAACU
 2651 UCCUAUGUAG GUCAGCAUGC GUGUACUUUA CGGAGUUAUAA AAACUCAGGU
 40 2701 GCCAAGCGGU AUGCUGAAUG CCUUAUUAACA CCACGACAAG CAGCACAAACU
 2751 UAGGAGAAAG CUAGAAUUCU UUACCUACGU CCGGUUCGAC CUGGAGCUGA
 2801 CGUUJUGUCAU ACAAGUACU CAACAGCCU CAACCACACA GAACCAAGAU
 45 2851 GCACAGAUCC UAACACACCA AAUUAUGUAU GUACCACCAAG GUGGACCUU
 2901 ACCAGAUAAA GUUGAUUCAU ACGUGUGGCA AACAUUCUACG AAUCCCAGUG
 2951 UGUUUJUGGAC CGAGGGAAAC GCCCCGCCGC GCAUGUCCAU ACCGUUUUUG
 50 3001 AGCAUJUGGCA ACGCCUAUUC AAAUUUCUAU GACGGAUGGU CUGAAUJJUC
 3051 CAGGAACGGA GUUUACGGCA UCAACACGCU AAACAACAUG GGCACGCUAU
 3101 AUGCAAGACA UGUCAACGCU GGAAGCACGG GUCCAAUAAA AAGCACCAUU
 3151 AGAAUCUACU UCAAACCGAA GCAUGUAAA GCGUGGUAAC CUAGACCACC
 3201 UAGACUCUGC CAAUACGAGA AGGCAAAGAA CGUGAACUUC CAACCCAGCG
 60 3251 GAGUJACCAC UACUAGGCAA AGCAUCACUA CAAUGACAAA UACGGCGCA
 3301 UUJGGACAAC AAUCAGGGGC AGUGUAUGUG GGGAACUACA GGGUGGUAAA

DE 39 39 200 A1

3351	UAGACAUCA GCUACCAGUG CUGACUGGCA AAACUGUGUG UGGGAAAGUU	
3401	ACAACAGAGA CCUCUUAGUG AGCACGACCA CAGCACAUUGG AUGUGAUAUU	
3451	AUAGCCAGAU GUCAGUGGCAC AACGGGAGUG UACUUUUGUG CGUCCAAAAA	5
3501	CAAGCACUAC CCAAUUUCGU UUGAAGGACC AGGUCUAGUA GAGGUCCAAG	
3551	AGAGUGAAUA CUACCCCAGG AGAUACCAAU CCCAUGUGCU UUUAGCAGCU	
3601	GGAUUUUCGG AACCAAGGUGA CUGUGGGGU AUCCUAAGGU GUGAGCAUGG	10
3651	UGUCAUJUGGC AUUGUGACCA UGGGGGGUGA AGGCGUGGUC GGCUUUGGCAG	
3701	ACAUCCGUGA UCUCUGUGG CUGGAAGAUG AUGCAAUGGA ACAGGGAGUG	
3751	AAGGACUAUG UGGAACAGCU UGGAAAUGCA UUCGGCUCCG GCUUUACUAA	15
3801	CCAAUAUGU GAGCAAGUCA ACCUCCUGAA AGAAUCACUA GUGGGUCAAG	
3851	ACUCCAUCUU AGAGAAAUCU CUAAAAGCCU UAGUUAAGAU AAUAUCAGCC	20
3901	UUAGUAAUJUG UGGUGAGGAA CCACGAUGAC CUGAUCACUG UGACUGGCCAC	
3951	ACUAGCCUU AUCGGUUGUA CCUCGUCCCC GUGGCGGUGG CUCAAACAGA	
4001	AGGUGUCACA AUAUUACGGA AUCCCUAUGG CUGAACGCCA AAACAAUAGC	25
4051	UGGCUUAAGA AAUJJACUGA AAUGACAAAU GCUJUGCAAGG GUAUGGAAUG	
4101	GAUAGCUGUC AAAAUUCAGA AAUUCAUUGA AUGGCUCAAA GUAAAAAUUU	
4151	UGCCAGAGGU CAGAGAAAAA CACGAGUUCC UGAACAGACU UAAACAACUC	30
4201	CCCUUAAUAG AAAGUCAGAU CGCCACAAUC GAGCAGAGCG CGCCAUCCCA	
4251	AAGUGACCAG GAACAAUUAU UUUCCAAUGU CCAAAUCUUU GCCCACUAUU	35
4301	GCAGAAAAGUA CGCUCCCCUC UACGCAGCUG AAGCAAAGAG GGUGUUCUCC	
4351	CUUGAGAAGA AGAUGAGCAA UUACAUACAG UUCAAGUCCA AAUGCCGUAU	
4401	UGAACCUUGUA UGUUJUGCUCC UGCCACGGAG CCCUGGUGCC GGCAAGUCGG	40
4451	UGGCAACAAA CUUAAUJUGA AGGUCCUUG CUGAGAAACU CAACAGCUA	
4501	GUGUACUCAC UACCGCCAGA CCCAGAUCAC UUCGACGGAU ACAAAACAGCA	
4551	GGCCGUGGUG AUUAUGGACG AUCUAUGCCA GAAUCCUGAU GGGAAAGACG	45
4601	UCUCCUJGUU CUGCCAAAUG GUUCCAGUG UAGAUUUUGU ACCACCCAUG	
4651	GCUGCCCUAG AAGAGAAAGG CAUUCUGUUC ACCUCACCGU UUGUCUUGGC	50
4701	AUCGACCAAU GCAGGAUCUA UUAAUGCUCU ACCCGUGUCA GAUAGCAGAG	
4751	CCUJUGGCAAG GAGAUUUCAC UUUGACAUGA ACAUCGAGGU UAUUUCCAU	
4801	UACAGUCAGA AUGGCAAGAU AAACAUGCCC AUGUCAGUCA AGACUUGUGA	55
4851	CGAUGAGUGU UGCCCGGUCA AUUUAAAAA GUGCUGCCCU CUUGUGUGUG	
4901	CGAAGGCUAU ACAAUUCAUU GAUAGAAGAA CACAGGUCAC AUACUCUUA	
4951	GACAUGCUAG UCACCGAGAU GUUUAGGGAG UACAAUCAUA GACAUAGCGU	60
5001	GGGGACCACG CUUGAGGCAC UGUUCCAGGG ACCACCAAGUA UACAGAGAGA	
5051	UCAAAAUUAG CGUUGCACCA GAGACACCAC CACCGCCCCGC CAUUGCGGAC	65

DE 39 39 200 A1

5 5101 C^YGCUCAAAU CGGUAGACAG UGAGGCUGUG AGGGAGUACU GCAAAGAAAA
 5151 AGGAUGGUUG GUUCCUGAGA UCAACUCCAC CCUCCAAUJJ GAGAAACAUG
 5201 UCAGUCGGGC UUUCAUUUGC UUACAGGCAU UGACCACAUU UGUGUCAGUG
 5251 GCUGGAAUCA UAUUAUAAU AUUAAGCUC UUUCGGGUU UUCAAGGUGC
 5301 UUAUACAGGA GUGCCCAACC AGAAGCCCAG AGUGCCUACC CUGAGGCAAG
 5351 CAAAAGUGCA AGGCCCUGCC UUUCAGUUCG CCGUCGCAAU GAUCAAAAGG
 5401 AACUCAAGCA CGGUGAAAAC UGAAUAUGGC GAGUUUACCA UGCUGGGCAU
 5451 CUAUGACAGG UGGGCCGUUU UGCCACGCCA CGCCAAACCU GGGCCAACCA
 5501 UCUUGAUGAA UGAUCAAGAG GUUGGUGUGC UAGAUGCCAA GGAGCUAGUA
 5551 GACAAGGACG GCACCAACUU AGAACUGACA CUACUAAAU UGAACCGGAA
 5601 UGAGAAGUUC AGAGACAUCA GAGGCUCUU AGCCAAGGAG GAAGUGGAGG
 5651 UUAAUGAGGC AGUGCUAGCA AUUAACACCA GCAAGUUUCC CAACAUGUAC
 5701 AUUCCAGUAG GACAGGUAC AGAAUACGGC UUCCUAAACC UAGGUGGCAC
 5751 ACCCCACCAAG AGAAUGCUUA UGUACAACUU CCCCACAAGA GCAGGCCAGU
 5801 GUGGUGGAGU GCUCAUGUCC ACCGGCAAGG UACUGGGUAI CCAUCUUGGU
 5851 GGAAAUGGCC AUCAGGGCUU CUCAGCAGCA CUCCUAAAC ACUACUUC
 5901 UGAUGAGCAA GGUGAAAUAG AAUUUAAJUGA GAGCUAAAG GACGCCGGU
 5951 UUCCAGUCAU CAACACACCA AGUAAAACAA AGUUGGAGCC UAGUGUUUUC
 6001 CACCAGGUCU UUGAGGGAA CAAAGAACCA GCAGUACUCA .GGAGUGGGGA
 6051 UCCACCGUCU AAGGCCAAUJ UUGAAGAGGC UAUAUUUUCC AAGUAAUAG
 6101 GAAAUGUCAA CACACACGUG CAUGAGUACA UGGUGGAAGC AGUGGACAC
 6151 UACGCAGGCC AACUAGCCAC CCUAGAUAC AGCACUGAAC CAAUGAAACU
 6201 GGAGGACGCA GUGUACGGUA CCGAGGGUCU UGAGGCUCUU GAUCUACAA
 6251 CGAGUGCCGG UUACCCAUU GUUGCACUGG GUAUCAAGAA GAGGGACAUC
 6301 CUCUCUAGA AGACUAGGA CCUACAAAG UUAAAGGAAU GUAUGGACAA
 6351 GUAUGGCCUG AACCUACCAA UGGUGACUUA UGUAAAAGAU GAGCUCAGGU
 6401 CCAUAGAGAA GGUAGCGAAA GGAAAGUCUA GGCUGAUJUGA GGCUGUCCAGU
 6451 UUCAAUGAUU CAGUGGCCAU GAGACAGACA UUUGGUAAUC UGUACAAAAC
 6501 UUUCACCUCU AACCCAGGGG UUGUGACUGG UAGUGCUGUU GGGUGUGACC
 6551 CAGACCUCUU UGGGAGCAAG AUACCAGUGA UGUUAGAUGG ACAUCUCAUA
 6601 GCAUUUGAUU ACUCUGGGUA CGAUGCUAGC UUAAGCCCUG UCUGGUUJUG
 6651 UUGCCUAAAA AUGUUACUUG AGAAGCUUJGG AUACACGCAC AAAGAGACAA
 6701 ACUACAUUGA CUACUJUGUGC AACUCCCAUC ACCUGUACAG GGAUAAACAU
 6751 UACUUUGUGA GGGGUGGCCAU GCCCUCGGGA UGUUCUGGUA CCAGUAUUU
 6801 CAACUCAAUG AUUAACAAUA UCAUAAUJUG GACACUAAUG CUAAAAGUGU
 6851 ACAAAAGGGAU UGACUJUGGAC CAAUCAGGA UGAUCGCAUA UGGUGAUGAU

DE 39 39 200 A1

6901	GUGAUCGCAU CGUACCCAUG GCCUAUAGAU GCAUCUUUAC UCGCUGAAGC	
6951	UGGUAAAGGU UACGGGCUGA UCAUGACACC AGCAGAUAGG GGAGAGUGCU	
7001	UUAACGAAGU UACCUGGACC AACGCCACUU UCCUAAAGAG GUAUUUUAGA	5
7051	GCAGAUGAAC AGUACCCUU CCUGGUGCAU CCUGUUAUGC CCAUGAAAGA	
7101	CAUACACGAA UCAAUUAGAU GGACCAAGGA UCCAAAGAAC ACCCAAGAUC	
7151	ACGUGCGCUC ACUGUGUCUA UUAGCTUGGC AUAACGGGG A GCACGAAUAU	10
7201	GAGGAGUCA UCCGUAAAAAU UAGAAGCGUC CCAGUCGGAC GUUGUUUGAC	
7251	CCUCCCCGCG UUUUCAACUC UACGCAGGAA GUGGUUGGAC UCCUUUUAGA	
7301	UUAGAGACAA UUUGAAUAA UUUAGAUUGG CUUAACCCUA CUGUGCUAAC	15
7351	CGAACCCAGAU AACGGUACAG UAGGGGUAAA UUCUCCGCAU UCGGUGCGG	

20 Besonders bevorzugte rekombinante DNAs enthalten erfindungsgemäß die Teilsequenz von Nukleotid 532 bis 2041, Nukleotid 2289 bis 3600, oder Nukleotid 6059 bis 7130 oder obengenannten Sequenz.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Mikroorganismen, welche eine erfindungsgemäße rekombinante DNA enthalten. Besonders bevorzugt sind hierbei die transformierten *E. coli*-Stämme VP4/2/3 (DSM 5558), VP1 und 3D^{Pol}.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, bei dem man das Polypeptid entweder aus einem der transformierten Mikroorganismen nach Aufschluß gewinnt oder eine erfindungsgemäße rekombinante DNA in geeignete Wirtszellen einbringt und das Polypeptid aus dem Kulturmedium, gegebenenfalls nach Aufschluß der Zellen, gewinnt. Vor allem bei Expression des Polypeptids in Eukaryonten erübrigt sich meist ein Zellaufschluß, da die Expressionsprodukte von den Zellen in das Kulturmumedium abgegeben werden und hierdurch die Isolierung erleichtert wird.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines oder mehrerer der erfindungsgemäßen Polypeptide, vorzugsweise einem der Polypeptide VP4/2/3, VP1 oder der Polymerase zur Erzeugung von gruppenspezifischen polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern gegen Enteroviren. Hierzu müssen jedoch nicht unbedingt die vollständigen Polypeptide verwendet werden, solange mindestens eine der entsprechenden antigenen Determinanten auf einem unvollständigen Polypeptid vorhanden ist.

35 Die Möglichkeit, Infektionen durch einen Virus der gesamten Familie der Enteroviren spezifisch nachzuweisen, wird durch einen weiteren Gegenstand der Erfindung, nämlich den gruppenspezifischen immunologischen Nachweis von Enteroviren bzw. Antikörpern im Blut oder Serum von zu untersuchenden Patienten ermöglicht, bei dem man in einem an sich bekannten immunologischen Test, vorzugsweise einem ELISA, mindestens eines der erfindungsgemäßen Polypeptide als Antigen oder gegen diese Polypeptide erzeugte Antikörper einsetzt. Bei der erfindungsgemäßen gruppenspezifischen Nachweismethode sind alle dem Fachmann geläufigen immunologischen Testmethoden anwendbar, bei denen im Blut oder Serum von Patienten Antigene oder Antikörper nachgewiesen werden sollen. Beim Nachweis von Antigenen im Blut oder Serum werden Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt, die dann das im Blut oder Serum vorhandene Antigen binden. Zum Nachweis von Antikörpern im Blut oder Serum von Patienten können die Polypeptide selbst sowie die mit den Polypeptiden generierten Antikörper eingesetzt werden. Der Nachweis über markierte Antigene oder Antikörper und die praktische Durchführung des Tests, z. B. mit wandgebundenen Antikörpern, Antigenen etc., wird nach an sich bekannten Methoden durchgeführt.

40 Erfindungsgemäß wird es durch die Auffindung der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche für alle über 70 Serotypen von Enteroviren spezifische antigene Determinanten enthalten, erstmals ermöglicht, einen gruppenspezifischen Nachweis gegen die gesamte Familie der Enteroviren zu führen. Dies ermöglicht die rasche und sichere Serodiagnostik von Patienten mit klinischem Verdacht auf Enterovirus-Infektionen, z. B. Verdacht auf Myokarditis, Myositis, Meningitis, Encephalitis, Pancreatitis oder auch postvirales Fatigue-Syndrom.

45 Fig. 1 zeigt hierbei den Aufbau eines direkten ELISA,

50 Fig. 2 zeigt den eines Sandwich-ELISA.

55 Die folgenden Beispiele erläutern in Verbindung mit den Abbildungen die Erfindung weiter.

Beispiel 1

Herstellung der Polypeptide

60 Zur Expression von Coxsackie-Virus B3 (CVB3) wurden die transformierten *E. coli*-Stämme VP4/2/3, VP1, 3D^{Pol} verwendet. Jeweils 100 ml einer frischen Übernachtkultur wurden in 350 ml selektives LB-Medium (LB-Medium supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin) überimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 620 nm von 1,2 bis 2,0 wachsen gelassen. Danach wurde die Temperatur auf 42°C erhöht, indem 450 ml 56°C warmes Medium langsam und unter ständigem Schwenken zugegeben wurden. Die Expressionstemperatur wurde für eine Stunde beibehalten. Anschließend wurden die Bakterien bei 3500 g (40 Minuten, 4°C) pelletiert. Die Pellets

wurden zur Lyse der Bakterien in PBS- (0,137 mmol/l NaCl, 3 mmol/l KCl, 6 mmol/l Na₂PO₄, 1 mmol/l KH₂PO₄), pH 7,2/1% SDS (Natriumdodecylsulfat) resuspendiert und 10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Die so erhaltene klare, proteinhaltige Lösung konnte direkt auf Polyacrylamidgele aufgetragen werden. Für den Einsatz im ELISA war die SDS-Konzentration jedoch zu hoch, so daß SDS mit einem zweifachen molaren Überschuß an KCl ausgefällt wurde.

5 Beispiel 2

10 A) Isolation rekombinanter Proteine durch gelelektrophoretische Methoden

15 Das Bakterienzellsatz wurde zur Auftrennung der Proteine auf ein vertikales Polyacrylamidgel (5%iges Sammelgel/13%iges Trenngel) aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli, 1970, Nature 227, S. 680–685). Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch eine Färbung mit Coomassie Blue sichtbar gemacht und anschließend distinkte virale Proteine präparativ rückisoliert. Dazu wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die Proteine aus dem Acrylamid im elektrischen Feld eluiert (Hunkapiller et al., 1983, Meth. Enzymol. 91, S. 227–236). Die Reinheit der gewonnenen Proteinproben wurde, nach Proteinbestimmung (W. Schaffner und C. Weissmann, (1973), A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. Anal. Biochem. 56, 502–514) in einer analytischen, vertikalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.

20 B) Isolation und Reinigung viraler Antigene durch Affinitäts-Chromatographie

25 Zur Minimierung unspezifischer Reaktionen im ELISA wurden die viralen Antigene vor Gebrauch über eine Affinitätssäule gereinigt. Dazu wurden die polyklonalen Antiseren, (entweder aVP1 oder aVP4/2/3 oder a3D^{Pol}) an Bromcyan aktivierte Sepharose gekoppelt. Die viralen Antigene enthalten in einem Lysat CVB3 (Coxsackie-Virus B3) infizierter Verozellen, wurden in Bindungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 8,0) aufgenommen und mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,05 ml/min über die entsprechenden Säulen aufgetrennt. Die adsorbierten Antigene (VP1 oder PV4/2/3 oder 3D^{Pol}) wurden anschließend mit derselben Flussgeschwindigkeit und einem Eluierungspuffer (100 mM Glycin, pH 2,7) von den gebundenen Antikörpern getrennt und in einem Eppendorfgefäß mit 0,5 M Carbonatpuffer aufgefangen. Zur Stabilisierung der Proben wurden diese anschließend über PD-10-Säulen (Pharmacia) in PBS- umgepuffert.

30 Beispiel 3

35 Reinigung der rekombinanten Proteine über eine Hydroxylapatit-Säule

40 Proteinproben, die zur Immunisierung verwendet werden, sollten keine zu hohe Konzentration an Detergentien, wie z. B. SDS oder NP40, enthalten, da dies für das Versuchstier tödlich sein kann. Deshalb wurden die Proben mit Hilfe einer Hydroxylapatit-Säule (G. Bernadi, Meth. Enzymol. 22 (1971) 325–339) von diesen Detergentien weitgehend befreit. Die Bindung der Proteine an die Matrix erfolgte in einem 0,01-mol/l-Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8). Im zweiten Schritt wurde das Detergens herausgewaschen, in dem 4 bis 5 Säulenvolumen desselben Puffers über die Säule gegeben wurden. Im letzten Schritt wurde dann das Protein mit einem 0,5-mol/l-Na-Phosphat-Puffer (pH 6,8) eluiert.

45 Beispiel 4

Generierung monoklonaler Antikörper und polyklonaler Antiseren

— Balb/c-Mäuse —

50 Zur Generierung monoklonaler Antikörper wurden ca. 6 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse nach folgendem Immunisierungsschema mit CVB3 infiziertem Verozell-Lysat immunisiert.

55	Tag	Proteindosis (µg) gelöst in:	CFA	IFA	PBS
	1	Priming 150 µg	•		
	21	Auffrischung 50 µg		•	
	35	Auffrischung 50 µg		•	
60	50	Auffrischung 50 µg			•
	51	Boost 20 µg			•
	52	Boost 20 µg			•
	53	Boost 20 µg			•

65 CFA = komplettes Freund'sches Adjuvans

IFA = inkomplettes Freund'sches Adjuvans

PBS = phosphatgepufferte Salzlösung

Für die einzelnen Immunisierungsschritte wurde die entsprechende Proteinmenge in den jeweiligen Zusätzen

emulgiert, 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach den Mäusen i. p. injiziert. Zur Überprüfung der Immunantwort wurde nach der ersten und zweiten Auffrischung den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und der Antikörpertiter des Serums gegen die rekombinanten CVB3-Proteine (VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}) im ELISA (siehe Beispiel 5A) bestimmt. Die Fusion der Immunglobulin-produzierenden Milzellen der nach obigem Schema immunisierten Mäuse und der Maus-Myelom Permanentzelllinie X63/Ag8.653 wurde nach der von G. Köhler und C. Milstein 1975 beschriebenen Methode durchgeführt (Nature 256, 495–497). Es schloß sich eine 14tägige Selektion durch HAT-Medium an, die sicherstellt, daß nur durch die Fusion entstandene Zellklone überleben. Die so erhaltenen Zellklone wurden nach der "Limiting Dilution" zweimal subkloniert. Die Zellklone, die spezifische Antikörper gegen CVB3-Proteine produzieren, wurden weiter kultiviert und einmal wöchentlich das Medium zu 2/3 abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Der abgenommene Zellüberstand wurde 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert und der klare Überstand bei –20°C eingefroren. In diesem Überstand sind ca. 5 bis 20 µg/ml monoklonale Antikörper enthalten, so daß sie 1 : 10 verdünnt im ELISA eingesetzt werden können.

— Kaninchen —

5

10

20

30

35

40

45

50

55

60

65

Zur Generierung der polyklonalen Antiseren wurden drei verschiedene, je sechs Monate alte weibliche Neuseeland-Kaninchen mit in E. coli exprimierten, aufgereinigten CVB3-Proteinen (entweder VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}) nach folgendem Schema immunisiert:

Tag	Proteindosis (µg) in:	CFA	IFA	PBS
1	Priming 150 µg	•		
13	Auffrischung 75 µg		•	
36	Auffrischung 75 µg		•	
64	Auffrischung 75 µg			•

alle 3 Monate eine weitere Auffrischung mit 75 µg Protein in PBS.

Vor jeder Auffrischung wurde dem Kaninchen 5 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und der jeweilige anti-CVB3-Protein-Antikörpertiter im ELISA bestimmt. 64 Tage nach der Erstimmunisierung war der Antikörpertiter so weit gestiegen, daß dem Kaninchen in vierwöchigen Abständen 20 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen werden konnte. Nach erfolgter Blutgerinnung bei Raumtemperatur wurde das Serum durch eine 10minütige Zentrifugation bei 300 g gewonnen, anschließend aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt.

Beispiel 5

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Im ELISA lassen sich Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen messen. Das Prinzip beruht darauf, daß entweder das Antigen an die Festphase gebunden, angeboten wird und dann der Antikörper bzw. die Existenz von Antikörpern in einem Serum gemessen wird, oder die Antikörper an die Festphase gebunden, angeboten werden und somit die Konzentration von Antigenen in einem Serum gemessen werden können.

Allgemein differenziert man zwischen zwei ELISA-Formen, dem direkten ELISA (siehe Fig. 1), hierbei wird das Substrat (entweder Antigen oder Antikörper) direkt an die Festphase gebunden und dem Sandwich ELISA (siehe Fig. 2). Bei diesem Prinzip wird das Antigen von einem Antikörper gebunden frei im Raum und in nativer Form präsentiert. Dies führt zu einer erheblichen Sensitivitätssteigerung des Testsystems (Moudalal et al., 1984, J. Immunol. Meth. 68, S. 35–43).

Lösungen:

Beschichtungspuffer: 100 mM Carbonatpuffer, pH 9,6
 Absättigungslösung: 0,5% BSA (Rinderserumalbumin) in PBS-
 Waschlösung: 1,5 M NaCl, 20% Tween 20
 Substratlösung:

a) 10% Diethanolpuffer: 97 ml 1 M Diethanolamin, 100 mg MgCl₂ × 6 H₂O mit 1 M NaCl pH 9,8 einstellen ad 1000 ml H₂O-bidest.
 b) PNNP(p-Nitro-phenyl-phosphat) in Diethanolpuffer lösen mit einer Konzentration von 1 mg/ml Stopp-Lösung: 3 M NaOH.

A) Direkter ELISA

Nachweis von enteroviralen Antikörpern in human Seren (Fig. 1)

Eines der viralen Antigene (VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}), gewonnen und gereinigt aus infizierten Vero-Zellsatzen (siehe Beispiel 2B) wurde in einer Konzentration von 300 ng/100 µl/Well (Vertiefung einer Plastik-Mikroti-

terplatte in Beschichtungspuffer verdünnt und bei 4°C inkubiert. Es folgt ein einmaliges Waschen mit der Waschlösung. Zur Absättigung freier Bindungsstellen der Plastikoberfläche wurden 200 µl Absättigungslösung/Well für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschlösung wurde das zu untersuchende Patientenserum in einer 1 : 10-Verdünnung (in PBS⁻ in einem Volumen von 100 µl für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgt ein dreimaliges Waschen mit der Waschlösung. Zum Nachweis der an CVB-Antigen gebundenen humanen Antikörper wird ein anti-human Immunglobulin-Konjugat mit der alkalischen Phosphatase (AP-Konjugat) in einem Volumen von 100 µl für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung wurden 100 µl PNPP-Substratlösung für 30 bis 60 Minuten bei 37°C im Dunklen inkubiert, anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung gestoppt und die Extinktion bei einer optischen Dichte von 405 nm (OD_{405 nm}) gemessen.

Nachweis von enteroviralem Antigen in human Seren (Fig. 1)

Alle Waschschrifte erfolgten analog dem oben beschriebenen Schemata. Die Patientenserien wurden 1 : 10 in Beschichtungspuffer verdünnt und für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Zur Absättigung freier Bindungsstellen der Plastikoberfläche wurden 200 µl Absättigungslösung/Well für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Inkubation mit Enterovirus-spezifischen polyklonalen Antiseren (aVP1 oder aVP4/2/3 oder a3D^{Pol}) 1 : 500 verdünnt in PBS⁻ für 2 Stunden bei 37°C. Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch eine einstündige Inkubation bei 37°C mit einem AP-Konjugat anti-Kaninchen-Immunglobulin in einem Volumen von 100 µl nachgewiesen. Zuletzt wurden 100 µl PNPP-Substratlösung für 30 bis 60 Minuten bei 37°C im Dunklen inkubiert, die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung gestoppt und die Extinktion bei einer OD_{405 nm} gemessen.

B) Sandwich ELISA (Fig. 2)

Als erste Komponente wurde eines der Affinitäts-gereinigten polyklonalen und Enterovirus-spezifischen Antiseren (aVP1 oder aVP4/2/3 oder a3D^{Pol}) in einer Konzentration von 300 ng/100 µl/Well an die Plastikoberfläche gebunden (18 Stunden bei 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit Waschlösung wurde das entsprechende aufgereinigte Antigen aus infizierten Verozell-Lysaten (siehe Beispiel 2B) (VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}) in einer Konzentration von 300 ng/100 µl/Well für 3 Stunden bei 37°C vorgelegt. Es schließen sich zwei Waschschritte an, bevor das 1 : 10 in PBS verdünnte Patientenserum für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurde. Nachdem dreimal gewaschen wurde, wurde das "Immun-Sandwich" bestehend aus polyklonalem Antikörper (Festphasenkomponente), Antigen und humanem Antikörper mit einem AP-Konjugat anti-human Immunglobulin nachgewiesen, durch eine einstündige Inkubation der entsprechenden Konjugatlösung. Vor der Substratreaktion wurde wiederum dreimal gewaschen, 100 µl Substratlösung zugegeben und nach 30 bis 60 Minuten Inkubation bei 37°C im Dunklen die Enzymreaktion mit 100 µl Stopp-Lösung abgebrochen. Zuletzt wurde wiederum die Extinktion bei einer OD_{405 nm} gemessen.

Beispiel 6

40 Immunoblot (Western-Blot)

Die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennten, affinitätschromatographisch gereinigten viralen Antigene (VP1 oder VP4/2/3 oder 3D^{Pol}) wurden mittels Elektro-Blotting (Semi-dry) auf Nitrocellulose transferiert. Der Nachweis dieser Antigene erfolgt durch eine spezifische Antikörperreaktion und nachfolgender enzymatischer Farbreaktion (Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. 76, S. 4350–4354), wodurch die humanen Antikörper (aus Patientenserum) spezifisch charakterisiert werden.

Lösungen:

50 Lösung I:
 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
 76 mM NaCl
 0,5% Gelatine
 55 2,5% BSA
 0,003% NP40

Lösung II:
 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 60 15 mM NaCl
 0,25% Gelatine
 0,1% BSA
 0,025% NP40

65 Antikörperlösung:
 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 15 mM NaCl
 0,25% Gelatine

3,0% BSA
0,025% NP40

Substratlösung:
100 mM Tris/HCl, pH 9,5

5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂

400 µm NBT in 70% Dimethylformamid

400 µm BCIP in 100% Dimethylformamid

10

NBT = Nitro-Blue-tetrazolium

BCIP = 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat

Nach erfolgter SDS-PAGE der viralen Antigene VP01, VP4/2/3, 3D^{pol} wurde auf der Kathode der Semi-Dry Apparatur das Polyacrylamidgel mit dem Nitrocellulosefilter (NC-Filter) als Sandwich zwischen jeweils drei Schichten Whatman 3-MM-Filterpapier aufgebaut. Die obere Graphitplatte (= Anode) wurde aufgesetzt und der Transfer mit einer konstanten Stromstärke von 150 mA über eine Zeitspanne von 90 Minuten durchgeführt.

15

Als Vorbereitung der Immunreaktion wurden die noch freien Proteinbindungsstellen der NC durch zweimal 10 Minuten Schwenken in Lösung I abgesättigt. Das Patientenserum wurde 1 : 20 in Antikörperlösung verdünnt und eine Stunde mit dem Filter inkubiert. Zum Entfernen der nicht oder unspezifisch gebundenen Antikörper wurde die NC dreimal 15 Minuten in Lösung II geschwenkt. Der zweite Antikörper, ein AP-anti-human-Immunglobulin-Konjugat 1 : 500 verdünnt in Antikörperlösung, wurde ebenfalls für eine Stunde mit dem NC-Filter inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit Lösung II für jeweils 15 Minuten. Vor der Farbreaktion wurde der Filter zwischen 3-MM-Whatmanpapier getrocknet. Es schloß sich eine Inkubation der NC in der Substratlösung für 5 bis 15 Minuten an, danach wurde die Enzymreaktion durch sechsmal Waschen des Filters mit destilliertem Wasser gestoppt. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Durch die Charakterisierung der humanen Antiseren im Western-Blot konnte gezeigt werden, daß tatsächlich ein entsprechendes Protein mit dem richtigen Molekulargewicht vom Antiserum erkannt wird.

20

25

Patentansprüche

30

1. Polypeptid, gekennzeichnet durch die folgende Aminosäuresequenz

35

40

45

50

55

60

65

DE 39 39 200 A1

5 MGAQVSTQ KTGAHETRLN ASGNSIIHYT NINYYKDAAS NSANRQDFTQ
DPGKFTEPVK DIMIKSLPAL NSPTVEECGY SDRARSITLG NSTITTQECA
N V V V G Y G V W P D Y L K D S E A T A E D Q P T Q P D V A T C R F Y T L D S V Q W Q K T S P G W W
W K L P D A L S N L G L F G Q N M Q Y H Y L G R T G Y T V H V Q C N A S K F H Q G C L L V V C V P E
A E M G C A T L D N T P S S A E L L G G D T A K E F A D K P V A S G S N K L V Q R V V Y N A G M G V
G V G N L T I F P H Q W I N L R T N N S A T I V M P Y T N S V P M D N M F R H N N V T L M V I P F V
P L D Y C P G S T T Y V P I T V T I A P M C A E Y N G L R L A G H Q G L P T M N T P G S C Q F L T S
D D F Q S P S A M P Q Y D V T P E M R I P G E V K N L M E I A E V D S V V P V Q N V G E K V N S M E
A Y Q I P V R S N E G S G T Q V F G F P L Q P G Y S S V F S R T L L G E I L N Y Y T H W S G S I K L
T F M F C G S A M A T G K F L L A Y S P P G A G A P T K R V D A M L G T H V I W D V G L Q S S C V L
C I P W I S Q T H Y R F V A S D E Y T A G G F I T C W Y Q T N I V V P A D A Q S S C Y I M C F V S A
C N D F S V R L L K D T P F I S Q Q N F F Q G P V E D A I T A A I G R V A D T V G T G P T N S E A I
P A L T A A E T G H T S Q V V P G D T M Q T R H V K N Y H S R S E S T I E N F L C R S A C V Y F T E
Y K N S G A K R Y A E W V L T P R Q A A Q L R R K L E F F T Y V R F D L E L T F V I T S T Q Q P S T
T Q N Q D A Q I L T H Q I M Y V P P G G P V P D K V D S Y V W Q T S T N P S V F W T E G N A P P R M
S I P F L S I G N A Y S N F Y D G W S E F S R N G V Y G I N T L N N M G T L Y A R H V N A G S T G P
I K S T I R I Y F K P K H V K A W I P R P P R L C Q Y E K A K N V N F Q P S G V T T R Q S I T T M
T N T G A F G Q Q S G A V Y V G N Y R V V N R H L A T S A D W Q N C V W E S Y N R D L L V S T T A
H G C D I I A R C Q C T T G V Y F C A S K N K H Y P I S F E G P G L V E V Q E S E Y Y P R R Y Q S H
V L L A A G F S E P G D C G G I L R C E H G V I G I V T M G G E G V V G F A D I R D L L W L E D D A
M E Q G V K D Y V E Q L G N A F G S G F T N Q I C E Q V N L L K E S L V G Q D S I L E K S L K A L V
K I I S A L V I V V R N H D D L I T V T A T L A L I G C T S S P W R W L K Q K V S Q Y Y G I P M A E
R Q N N S W L K K F T E M T N A C K G M E W I A V K I Q K F I E W L K V K I L P E V R E K H E F L N
R L K Q L P L L E S Q I A T I E Q S A P S Q S D Q E Q L F S N V Q Y F A H Y C R K Y A P L Y A A E A
K R V F S L E K K M S N Y I Q F K S K C R I E P V C L L L H G S P G A G K S V A T N L I G R S L A E
K L N S S V Y S L P P D P D H F D G Y K Q Q A V V I M D D L C Q N P D G K D V S L F C Q M V S S V D
F V P P M A A L E E K G I L F T S P F V L A S T N A G S I N A P T V S D S R A L A R R F H F D M N I
E V I S M Y S Q N G K I N M P M S V K T C D D E C C P V N F K K C C P L V C G K A I Q F I D R R T Q
V R Y S L D M L V T E M F R E Y N H R H S V G T T L E A L F Q G P P V Y R E I K I S V A P E T P P P
55

60

65

PAIADLLKSV DSEAVREYCK EKGWLVPEIN STLQIEKHVS RAFICLQALT
 TFVSVAGIIY IIYKLFAGFQ GAYTGVNPQK PRVPTLRQAK VQGPAFEFAV
 AMMKRNSSTV KTEYGEFTML GIYDRWAVLP RHAKPGPTIL MNDQEVGVD
 AKELVDKDGT NLELTLLKLN RNEKFRDIRG FLAKEEVEVN EAVALINTSK
 FPNMYIPVGQ VTEYGFNLG CTPTKRMILMY NFPTTRAGQCG GVLMSTGKVL
 GIHVGGNGHQ GFSALLKHY FNDEQGEIEF IESSKDAGFP VINTPSKTKL
 EPSVFHQVFE GNKEPAVLR GDPRILKANFE EAIFSKYIGN VNTHVDEYML
 EAVIDHYAGQL ATLDISTEPM KLEDAVYGT ELEALDLTT AGYPYVALGI
 KKRDILSKKT KDLTKLKECM DKYGLNLPMV TYVKDELRSI EKVAKGKSRL
 IEASSLNDSV AMRQTFGNLY KTFHLNPGVV TGSAGVCDPD LFWSKIFVML
 DGHЛИAFDYS GYDASLSPVW FACLKMLEK LGYTHKETNY IDYLCNSHHL
 YRDKHYFVRG GMPSGCSGTS IFNSMINNII IRTLMLKVKYK GIDLDQFRMI
 AYGDDVIASY PWPIDASLLA EAGKGYGLIM TPADKGECKN EVWTWTNATFL
 KRYFRADEQY PFLVHPVMPM KDIHESIRWT KDPKNTQDHV RSLCLLAWHN
 GEHEYEEFIR KIRSVPVGRC LTLPAFSTLR RKWLDSF

2. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die im folgenden angegebene Teilsequenz der Sequenz von Anspruch 1 enthält (VP4/2/3).

AQVSTQ KTGAHETRLN ASGNSIIHYT NINYYKDAAS NSANRQDFTQ
 DPGKFTEPVK DIMIKSLPAL NSPTVEECGY SDRARSITLG NSTITTQECA
 NVVVGYGVWP DYLDKSEATA EDQPTQPDVA TCRFYTLDSV QWQKTSPGWW
 WKLPDALSNL GLFGQNMQYH YLGRTGYTVH VQCNASKFHQ GCLLVVCVPE
 AEMGCATLDN TPSSAELLGG DTAKEFADKP VASGSNKLVQ RVVYNACMGV
 GVGNLTIFPH QWINLRTNNS ATIVMPYTN VPMNDNMFRHN NVTLMVIPFV
 PLDYCPGTT YVPITVTIAP MCAEYNGLRL AGHQGLPTMN TPGSCQFLTS
 DDFQSPSAMP QYDVTPEMRI PGEVKNLMEI AEVDSVVPVQ NVGEKVNNSME
 AYQIPVRSNE GSCTQVFGFP LQPGYSSVFS RTLLGEILNY YTHWSGSI

3. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die im folgenden angegebene Teilsequenz der Sequenz von Anspruch 1 enthält (VP1).

55

60

65

SDEYTA GGFITCWYQT NIVVPAQSCS SCYIMCFVSA
CNDFSVRLLK DTPFISQQNF FQGPVEDAIT AAIGRVADTV GTGPTNSEAI
PALTAAETGH TSQVVPGDTM QTRHVKNYHS RSESTIENFL CRSACVYFTE
YKNSGAKRYA EWVLTPRQAA QLRRKLEFFT YVRFDLELTF VITSTQQPST
TQNQDAQILT HQIMYVPPGG PVPDKVDSYV WQTSTNPSVF WTEGNAPPBM
S1PFLSIGNA YSNFYDGWSE FSRNGVYGIN TLNNMGTLYA RHVNAGSTGP
IKSTIRIYFK PKHVKAWIPR PPRLCQYEKA KNVNQPSGV TTRQSQITTM
TNTGAFGQQS GAVYVGNYRV VNRHLATSAD WQNCVWESYN RDLLVSTTTA
HGCDDIARCQ CTTGVYFCAS KNKHYPISFE GPGLVEVQES EYYPRRYQSH
VL

4. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es die im folgenden angegebene Teilsequenz der Sequenz von Anspruch 1 enthält (3D_{Pol}):

RS GDPLRKANFE EAIFSKYIGN VNTHVDEYML
EAVDHYAGQL ATLDISTEPM KLEDAVYGTE GLEALDLTTS AGYPYVALGI
KKRDILSKKT KDLTKLKECM DKYGLNLPMV TYVKDELRSI EKVAKGKSRL
IEASSLNDSV AMRQTFGNLY KTFHLPNGVV TGSAVGCDPD LFWSKIPVML
DGHHLIAFDYS GYDASLSPVW FACLKMLLEK LGYTHKETNY IDYLCNSHHL
YRDKHYFVRG GMPSGCSGTS IFNSMINNII IRTLMLKVYK GIDLQFRMI
AYGDDVIASY PWPIDASLLA EAGKGYGLIM TPADKGECFN EVTWTNATFL
KRYFRADEQY PFLVHPVMPM KDIHESIRW

5. Polypeptid dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine der auf den Polypeptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthaltenen antigenen Determinanten enthält.
6. Rekombinante DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert, einligiert in einen Expressionsvektor enthält.
7. Rekombinante DNA nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die folgende Sequenz enthält:

50

55

60

65

DE 39 39 200 A1

1 UUAAAACAGC CUGUGGGUUG AUCCACCCA CAGGCCAUU GGGCGCUAGC
51 ACUCUGGUAU CACGGUACCU UUGUGCGCCU GUUUUAUACC CCCUCCCCCA
101 ACUGUAACUU AGAAGUAACA CACACCGAUC AACAGUCAGC GUGGCACACC 5
151 AGCCACGUUU UGAUCAAGCA CUUCUGUUAC CCCGGACUGA GUAUCAAUAG
201 ACUGCUCACG CGGUUGAAGG AGAAAGCGUU CGUUAUCCGG CCAACUACUU
251 CGAAAAACCU AGUAACACCG UGGAAGUUGC AGAGUGUUJC GCUCAGCACU 10
301 ACCCCAGUGU AGAUCAGGUC GAUGAGUCAC CGCAUUCCCC ACGGGGGACCC
351 GUGGCGGUGG CUGCGUUGGC GGCCUGCCCA UGGGGAAACC CAUGGGACGC 15
401 UCUAAUACAG ACAUGGUGCG AAGAGUCUAU UGAGCUAGUU GGUAGUCCUC
451 CGGCCCCUGA AUGCGGCUAA UCCUAACUGC GGAGCACACA CCCUCAAGCC
501 AGAGGGCAGU GUGUCGUAAAC GGGCAACUCU GCAGCGGAAC CGACUACUUU 20
551 GGGUGUCCGU GUUUCAUUUU AUUCCUAUAC UGGCUGCUUA UGGUGACAAU
601 UCAGAGAUCG UUACCAUAUA GCUAUUGGAU UGGCCAUCUG GUGACUAAUA
651 GAGCUAUUAU AUAUCCUUU GUUGGGUUUA UACCACUJAG CUUGAAAGAG 25
701 GUUAAAACAU UACAAUUCAU UGUUAAGUUG AAUACAGCAA AAUGGGAGCU
751 CAAGUAUCAA CGCAAAAGAC UGGGGCACAU GAGACCAGGC UGAAUGCUAG
801 CGGCAAUUCC AUCAUUCACU ACACAAAUUUAU UAAUUAUJAC AAGGAUGCCG 30
851 CAUCCAACUC AGCCAAUCGG CAGGAUUUCA CUCAAGACCC GGGCAAGUUC
901 ACAGAACCAAG UGAAAGAUUAU CAUGAUUAAA UCACUACCAAG CUCUCAACUC
951 CCCCCACAGUA GAGGAGUGCG GAUACAGUGA CAGGGCGAGA UCAAUCACAU 35

40

45

50

55

60

65

DE 39 39 200 A1

1001 UAGGUAAUC CACCAUAACG ACUCAGGAAU GCGCCAACGU GGUGGGUGGC
 1051 UAUGGAGUAU GGCCAGAUUA UCUAAAGGAU AGUGAGGCAA CAGCAGAGGA
 1101 CCAACCGACC CAACCAGACG UUGCCACAUG UAGGUUCUAU ACCCUUGACU
 1151 C'GUGCAAUG GCAGAAAACC UCACCAGGAU GGUGGGUGGAU GCUGCCCGAU
 1201 GCUTUUGUCGA ACUUAGGACU GUUUGGGCAG AACAUUGCAGU ACCACUACUU
 1251 AGGCCGAACU GGGUAIUACCG UACAUGUGCA GUGCAAUGCA UCUAAGUUCC
 1301 ACCAAGGAUG CUUGCUAGUA GUGUGUGUAC CGGAAGCUGA GAUGGGUUGC
 1351 GCAACGCUAG ACAACACCCC AUCCAGUGCA GAAUUGCUGG GGGGCGAUAC
 1401 GGCAAAGGAG UUUGCAGACA AACCGGUCGC AUCCGGGUCC ACAAGUUGG
 1451 UACAGAGGGU GGUCUAAAU GCAGGCAUGG GGGUGGGUGU UGGAAACCUC
 1501 ACCAUUUUCC CCCACCAAUG GAUCAACCUA CGCACCAAUA AUAGUGCUAC
 1551 AAUUGUGAUG CCAUACACCA ACAGUGUACC UAUCCAUAA AUGUUUAGGC
 1601 AUAACAAACGU CACCCUAAUG GUUAUCCAU UJGUACCGCU AGAUUACUGC
 1651 CCUGGGUCCA CCACGUACGU CCCAAUUACG GUCACGAUAG CCCCAAUGUG
 1701 UGCCGAGUAC AAUGGGUAC GUUAGCAGG GCACCAGGGC UUACCAAACCA
 1751 UGAAUACUCC GGGGAGCUGU CAAUUCUGA CAUCAGACGA CUICCAAUCA
 1801 CCAUCCGCCA UGCCGAAUA UGACGUACA CCAGAGAUGA GGAAUACCUGG
 1851 UGAGGUGAAA AACUUGAUGG AAAUAGCUGA GGUUGACUCA GUUGUCCAG
 1901 UCCAAAUGU UGGAGAGAAG GUCAACUCUA UGGAAGCAUA CCAGAUACCU
 1951 GUGAGAUCCA ACGAAGGAUC UGGAACGCAA GUAUUCGGCU UUCCACUGCA
 2001 ACCAGGGUAC UCGAGUGUUU UUAGUCGGAC GCUCCUAGGA GAGAUCUUGA
 2051 ACUAUUAUAC ACAUUGGUCA GGCAGCAUAA AGCUUACGUU UAUUUUCUGU
 2101 GGUUCGGCCA UGGCUACUGG AAAAUUCCUU UUUGGCAUACU CACCACCAGG
 2151 UGCUGGAGCU CCUACAAAAA GGGUUGAUGC UAUCCUUGGU ACUCAUGUAA
 2201 UUUGGGACGU GGGGCUACAA UCAAGUUGCG UGCUGUGAU ACCCUGGAUA
 2251 AGCCAAACAC ACUACCGUU UGUUGCUUCA GAUGAGUUA CCGCAGGGGG
 2301 UUUUAUUACG UGCUGGUAC AACAAACAU AGUGGUCCCA GCGGAUGCCCC
 2351 AAAGCUCCUG UUACAUCAUG UGUUUCGUGU CAGCAUGCAA UGACUUCUCU
 2401 GUCAGGCCAU UGAAGGACAC UCCUUUCAUU UCGCAGCAA ACUUUUUCCA
 2451 GGGCCCAGUG GAAGACCGGA UAACAGCCGC UAUAGGGAGA GUUGCGGAUA
 2501 CCGUGGGUAC AGGGCCAACC AACUCAGAAG CUAUACCAGC ACUCACUGCU
 2551 GCUGAGACGG GUCACACGGU ACAAGUAGUG CCGGGUGACCA CUAUCCAGAC
 2601 ACGCCACGUU AAGAACUACC AUUCAAGGUC CGAGUCAACC AUAGAGAACU
 2651 UCCUAUGUAG GUCAGCAUGC GUGUACUUUA CGGAGUAA AACACUCAGGU

DE 39 39 200 A1

2701	GCCAAGCGGU AUGCUGAAUG GGUAUUAACA CCACGACAAG CAGCACACU	
2751	UAGGAGAAAG CUAGAAUUCU UUACCUACGU CCGGUUCGAC CUGGAGCUGA	
2801	CGUUUUGUCAU AACAAAGUACU CAACAGCCU CAACCACACA GAACCAAGAU	5
2851	GCACAGAUCC UAACACACCA AAUUAUGUAU GUACCACAG GUGGACCUGU	
2901	ACCAGAUAAA GUUGAUUCAU ACGUGUGGCA AACAUUCUACG AAUCCCAGUG	
2951	UGUUUUJUGGAC CGAGGGAAAC GCCCCGCCGC GCAUGUCCAU ACCGUUUUJUG	10
3001	AGCAUUGGCA ACGCCUAAUUC AAAUUUCUAU GACGGAUGGU CUGAAUUUUC	
3051	CAGGAACGGA GUUUACGGCA UCAACACGCU AAACAACAUG GGCACCGCUAU	
3101	AUGCAAGACA UGUCAACGCU GGAAGCACGG GUCCAAUAAA AAGCACCAUU	15
3151	ACAAUUCUACU UCAAACCGAA GCAUGUAAA GCGUGGUAAC CUAGACCACC	
3201	UAGACUCUGC CAAUACGAGA AGGCAAAGAA CGUGAACUUC CAACCCAGCG	20
3251	GAGUUACAC UACUAGGCAA AGCAUCACUA CAAUGACAAA UACGGGCGCA	
3301	UUJUGGACAAC AAUCAGGGGC AGCUGUAUGUG GGGAACUACA CGCUGGUAAA	
3351	UAGACAUACUA GCUACCAGUG CUGACUGGCA AAACUGUGUG UGGGAAAGUU	25
3401	ACAACAGAGA CCUCUUAGUG AGCACGACCA CAGCACAUUG AUGUGAUUU	
3451	AUAGCCAGAU GUCAGUGCAC AACGGGAGUG UACUUUUGUG CGUCCAAAAAA	
3501	CAAGCACUAC CCAUUUUCGU UUGAAGGACC AGGUCUAGUA GAGGUCCAAG	30
3551	AGAGUGAAUA CUACCCCAGG AGAUACCAAU CCCAUGUGCU UUUAGCAGCU	
3601	GGAUUUUCCG AACCAGGUGA CUGUGGCGGU AUCCUAAGGU GUGAGCAUGG	
3651	UGUCAUUGGC AUUGUGACCA UGGGGGGUGA AGGCGUGGUC GGCUTUJUGCAG	35
3701	ACAUCCGUGA UCUCCUGUGG CUGGAAGAUG AUGCAAUGGA ACAGGGAGUG	
3751	AAGGACUAUG UGGAACAGCU UGGAAAUGCA UUCGGCUCCG GCUUUACUAA	40
3801	CCAAAUAUGU GAGCAAGUCA ACCUCCUGAA AGAAUACACUA GUGGGUCAAG	
3851	ACUCCAUUU AGAGAAAUCU CUAAAAGCCU UAGUUAAGAU AAUAUCAGCC	
3901	UUJAGUAAUUG UGGUGAGGAA CCACGAUGAC CUGAUCACUG UCACUCCAC	45
3951	ACUAGCCCUU AUCGGUUGUA CCUCGUCCCC GUGGCCGUUG CUAAACAGA	
4001	AGGUGUCACA AAUUAUCGGA AUCCCUAUGG CUGAACGCCA AAACAAUAGC	
4051	UGGCUUAAGA AAUUAUCUGA AAUGACAAAU GCUUGCAAGG GUAUGGAAUG	50
4101	GAUAGCUGUC AAAAUUCAGA AAUUCAUUGA AUGGCUCAAA GUAAAAAUUU	
4151	UGCCAGAGGU CAGAGAAAAA CACGAGUCC UGAACAGACU UAAACAACUC	
4201	CCCUUAUUAG AAAGUCAGAU CGCCACAAUC GAGCAGAGCG CGCCAUCCCA	55
4251	AAGUGACCAG GAACAAUUAU UUUCCAAUGU CCAAUACUUU GCCCACUAUU	
4301	GCAGAAAGUA CGCUCCCCUC UACGCAGCUG AAGCAAAGAG GGUGUUCUCC	60
4351	CUTUGAGAAGA AGAUGAGCAA UUACAUACAG UUCAAGUCCA AAUGCCGUAU	

DE 39 39 200 A1

4401 UGAACCUGUA UGUUJUGCUCC UGCACGGGAG CCCUGGUGCC GGCAAGUCGG
 4451 UGGCAACAAA CUUAAUUGGA AGGUUCGUUG CUGAGAAACU CAACAGCUA
 5 4501 GUGUACUCAC UACCGCCAGA CCCAGAUCAC UUCGACGGAU ACAAACAGCA
 4551 GGCGUGGGUG AUUAUGGACG AUCUAUGCCA GAAUCCUGAU GGGAAAGACG
 10 4601 UCUCCUUGUU CUGCCAAAUG GUUUCAGUG UAGAUUUUGU ACCACCCAUG
 4651 GCUGCCCUAG AAGAGAAAGG CAUUCUGUUC ACCUCACCGU UUGUCUUGGC
 4701 AUCGACCAAU GCAGGAUCUA UUAAUGCUCC AACCGUGUCA GAUAGCAGAG
 15 4751 CCUUGGCAAG GAGAUUUCAC UUUGACAUCA ACAUCGAGGU UAUUUCCAUG
 4801 UACAGUCAGA AUGGCAAGAU AAACAUGCCC AUGUCAGUCA AGACUUGUGA
 4851 CGAUGAGUGU UGCCCGGUCA AUUUUAAAAA GUGCUGCCU CUUGUGUGUG
 20 4901 GGAAGGCUAU ACAAUUCAUU GAUAGAAGAA CACAGGUCAG AUACUCUCA
 4951 GACAUGCUAG UCACCGAGAU GUUJAGGGAG UACAAUCAUA GACAUGCGU
 5001 GGGGACCACG CUUGAGGCAC UGUUCCAGGG ACCACCAGUA UACAGAGAGA
 25 5051 UCAAAAUUAG CGUUGCACCA GAGACACCAC CACCGCCCCC CAUUGCGGAC
 5101 C^YCCUCAAAU CGGUAGACAG UGAGGCUGUG AGGGAGUACU GCAAAGAAAA
 5151 AGGAUGGUUG GUUCCUGAGA UCAACUCCAC CCUCCAAAUU GAGAAACAUG
 30 5201 UCAGUCGGGC UUUCAUUUGC UUACAGGCAU UGACCACAUU UGUGUCAGUG
 5251 GCUGGAAUCA UAUUAUAAAUAUUAAGCUC UUUGCGGGUU UUCAAGGUGC
 5301 UUAUACAGGA GUGCCCAACC AGAAGCCCAG AGUGCCUACC CUGAGGCAAG
 35 5351 CAAAAGUGCA AGGCCUGCC UUUGAGUUCG CCGUCGCAAU GAUGAAAAGG
 5401 AACUCAAGCA CGGUGAAAAC UGAAUAUGGC GAGUUUACCA UGCUGGGCAU
 40 5451 CUAUGACAGG UGGGCCGUUU UGCCACGCCA CGCCAAACCU GGGCCAACCA
 5501 UCUUGAUGAA UGAUCAAGAG GUUGGUGUGC UAGAUGCCAA GGAGCUAGUA
 5551 GACAAGGACG GCACCAACUU AGAACUGACA CUACUAAAUA UGAACCGGAA
 45 5601 UGAGAAGUUC AGAGACAUCA GAGGCUCUUA AGCCAAGGAG GAAGUGGGAGG
 5651 UUAAUGAGGC AGUGCUAGCA AUUAACACCA GCAAGUUUCC CAACAUUAC
 5701 AUUCCAGUAG GACAGGUAC AGAAUACGGC UUCCUAAAACC UAGGUGGCAC
 5751 ACCCACCAAG AGAAUGCUUA UGUACAACUU CCCCACAAGA GCAGGCCAGU
 5801 GUGGUGGAGU GCUCAUGUCC ACCGGCAAGG UACUGGGUAU CCAUGUUGGU
 5851 GGAAAUGGCC AUCAGGGCUU CUCAGCAGCA CUCCUAAAC ACUACUUCAA
 5901 UGAUGAGCAA GGUGAAAUAAG AUUUUAUUGA GAGCUAAAG GACGCCGGU
 5951 UUCCAGUCAU CAACACACCA AGUAAAACAA AGUUGGAGCC UAGUGUUUUC
 60 6001 CACCAGGUCU UUGAGGGAA CAAAGAACCA GCAGUACUCA GGAGUGGGGA
 6051 UCCACGUCUC AAGGCCAAUU UUGAAGAGGC UAUAUUUUCC AAGUUAUAG
 6101 GAAAUGUCAA CACACACGUG GAUGAGUACA UGCUGGAAGC AGUGGACCAC

DE 39 39 200 A1

6151	UACGCAGGCC AACUAGCCAC CCUAGAUAC AGCACUGAAC CAAUGAAACU	
6201	GGAGGACGCA GUGUACCGUA CCGAGGGUCU UGAGGCGCUU GAUCUAACAA	
6251	CGAGUGCCGG UUACCCAUAU GUUGCACUGG GUAUCAAGAA GAGGGACAUC	5
6301	CUCUCUAAGA AGACUAAGGA CCUAACAAAG UUAAAGGAAU GUAUGGACAA	
6351	GUAUGGCCUG AACCUACCAA UGGUGACUUA UGUAAAAGAU GAGCUCAGGU	
6401	CCAUAGAGAA GGUAGCGAAA GGAAAGUCUA GGCUGAUJUGA GGCUCUCCAGU	10
6451	UUGAAUGAUU CAGUGGCCAU GAGACAGACA UUUGGUAAUC UGUACAAAAC	
6501	UUUCCACCUA AACCCAGGGG UUGUGACUGG UAGUGCUGUU GGGUGUGACC	15
6551	CAGACCUCUU UUGGAGCAAG AUACCAGUGA UGUUAGAUGG ACAUCUCAUA	
6601	GCAUUUGAUU ACUCUGCCUA CGAUGCUAGC UUAAGCCCUG UCUGGUUUGC	
6651	UUGCCUAAAA AUGUUACUUG AGAACGUUGG AUACACGCAC AAAGAGACAA	20
6701	ACUACAUUGA CUACUUCUGGC AACUCCCAUC ACCUGUACAG GGAUAAAACAU	
6751	UACUUUGUGA GGGGUGGCAU GCCCUUCGGGA UGUUCUGGUA CCAGUAUJJUU	
6801	CAACUCAAUG AUUAACAAUA UCAUAAUAG GACACUAAUG CUAAAAGUGU	25
6851	ACAAAGGGAU UGACUUGGAC CAAUUCAGGA UGAUCGCAUA UGGUGAUGAU	
6901	GUGAUCGCAU CGUACCCAUG GCCUAUAGAU GCAUCUUUAC UCCGCUAAGC	
6951	UGGUAAGGGU UACGGGCGUA UCAUGACACC AGCAGAUAAAG GGAGAGUGCU	30
7001	UUAACGAAGU UACCUUGGACC AACGCCACUU UCCUAAAGAG GUAUUUUAGA	
7051	GCAGAUGAAC AGUACCCCUU CCUGGUGCAU CCUGUUAUGC CCAUGAAAGA	
7101	CAUACACGAA UCAAUAGAU GGACCAAGGA UCCAAAGAAC ACCCAAGAAC	35
7151	ACGUGCGCUC ACUGUGUCUA UUAGCUUGGC AUAACGGGG ACGACAAUAU	
7201	GAGGAGUCA UCCGUAAAAU UAGAAGCCUC CCAGUCGGAC GUUGUUUGAC	40
7251	CCUCCCCGCG UUUUCAACUC UACGCAGGAA GUGGUUGGAC UCCUUUUAGA	
7301	UUAGAGACAA UUUGAAAUAA UUUAGAUUGG CTTAACCCUA CUGUGCUAAC	
7351	CGAACCCAGAU AACGGUACAG UAGGGUAAA UUCUCCGCAU UCCGUGCGG	45

8. Rekombinante DNA nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotide 532 bis 2041 der Sequenz von Anspruch 7 enthält.

532	CAGCGGAAC CGACUACUUU	
551	GGGUGUCCGU GUUUCAUUUU AUUCCUAUAC UGGCUGCUUA UGGUGACAAU	55
601	UGAGAGAU UUACCAUAUA GCUAUUGGAU UGGCCAUCGG GUGACUAAUA	

60

65

DE 39 39 200 A1

651 GAGCUAUUAU AUAUCCUUU GUUGGGUUUA UACCACUUAG CUUGAAAGAG
701 GUAAAACAU UACAAUUCAU UGUUAAGUUG AAUACAGCAA AAUGGGAGCU
5 751 CAAGUAUCAA CGCAAAAGAC UGGGGCACAU GAGACCAGGC UGAAUGCUAG
801 CGGCAAUUCC AUCAUUCACU ACACAAAUU UAAUUAUAC AAGGAUGCCG
851 CAUCCAACUC AGCCAAUCGG CAGGAUUUCA CUCAAGACCC GGGCAAGUUC
10 901 ACAGAACCAAG UGAAAGAUUA CAUGAUAAA UCACUACCAAG CUCUCAACUC
951 CCCCCACAGUA GAGGAGUGCG GAUACAGUGA CAGGGCGAGA UCAAUCACAU
15 1001 UAGGUACUC CACCAUAACG ACUCAGGAAU GCGCCAACCU GGUGGUGGGC
1051 UAUGGAGUAU GGCCAGAUUA UCUAAAGGAU AGUGAGGCAA CAGCAGAGGA
1101 CCAACCGACC CAACCAGACG UUGCCACAUG UAGGUUCUAU ACCCUUGACU
20 1151 CUGUGCAAUG GCAGAAAACC UCACCAGGAU GGUGGUGGAA GCUGCCCGAU
1201 GCUUUGUCGA ACUUAGGACU GUUUGGGCAG ACAUUGCAGU ACCACUACUU
1251 AGGCCGAACU GGGUAUACCG UACAUGUGCA GUGCAAUGCA UCUAAGUUC
25 1301 ACCAAGGAUG CUUGCUAGUA GUGUGUGUAC CGGAAGCUGA GAUGGGUUGC
1351 GCAACCGCUAG ACAACACCCC AUCCAGUGCA GAAUUGCUGG GGGCGAUAC
1401 GGCAAAGGAG UUUGCGGACA AACCGGUUCGC AUCCGGGUCC ACAAGUUGG
1451 UACAGAGGGU GGUGUAUAAU GCAGGCAUGG GGGUGGGUGU UGGAAACCUC
1501 ACCAUUUUCC CCCACCAAUG GAUCAACCUC CGCACCAAUA AUAGUGCUAC
30 1551 AAUUGUGAUG CCAUACACCA ACAGUGUACC UAUGGUAAC AUGUUUAGGC
1601 AUAACAACGU CACCCUAAUG GUUAUCCAU UUGUACCGCU AGAUUACUGC
1651 CCUGGGUCCA CCACGUACGU CCCAAUUACG GUCACGAUAG CCCCAAUGUG
40 1701 UGCCGAGUAC AAUGGGUUAC GUUUAGCAGG GCACCAGGGC UUACCAACCA
1751 UGAAUACUCC GGGGAGCUGU CAAUUCUGA CAUCAGACGA CUUCCAAUCA
1801 CCAUCCGCCA UGCCGCAAUA UGACGUCACA CCAGAGAUGA GGAAUACCU
45 1851 UGAGGUGAAA AACUUGAUGG AAAUAGCUGA GGUGACUCA GUUGUCCAG
1901 UCCAAAAGU UGGAGAGAAG GUCAACUCUA UGGAAGCAUA CCAGAUACCU
1951 GUGAGAUCCA ACCAAGGAUC UGGAACCCAA GUAUUCGGCU UUCCACUGCA
50 2001 ACCAGGGUAC UCGAGUGUUU UUAGUCGGAC GCUUCCUAGGA G

55 9. Rekombinante DNA nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotide 2289 bis 3600 der Sequenz von Anspruch 7 enthält.

60

65

DE 39 39 200 A1

2289	UA CCGCAGGGGG	
2301	UUUUAUUACG UGCUGGUAUC AAACAAACAU AGUGGUCCCA GCGGAUGCCC	
2351	AAAGCUCCUG UUACAUCAUG UGUUUCGUGU CAGCAUGCAA UGACUUCUCU	5
2401	GUCAGGCUAU UGAAGGACAC UCCUUUCAUU UCGCAGCAA ACUUUUUCCA	
2451	GGGCCAGUG GAAGACGCGA UAACAGCCGC UAUAGGGAGA GUUGCGGAUA	
2501	CCGUGGGUAC AGGGCCAACC AACUCAGAAG CUAUACCAGC ACUCACUGCU	10
2551	GCUGAGACGG GUACACGGUC ACAAGUAGUG CCGGGUGACA CUAUCCAGAC	
2601	ACGCCACGUU AAGAACUACC AUUCAAGGUC CGAGUCAACC AUAGAGAACU	
2651	UCCUAUGUAG GUCAGCAUGC GUGUACUUUA CGGAGUUA AAACUCAGGU	15
2701	GCCAAGCGGU AUGCUGAAUG GGUAUUAACA CCACGACAAG CAGCACACU	
2751	UAGGAGAAAG CUAGAAUUCU UUACCUACGU CCGGUUCGAC CUGGAGCUGA	
2801	CGUUJUGUCAU AACAAGUACU CAACAGCCCU CAACCACACA GAACCAAGAU	20
2851	GCACAGAUCC UAACACACCA AAUUAUGUAU GUACCACCAAG GUGGACCUU	
2901	ACCAGAUAAA GUUGAUUCAU ACGUGUGGCA AACAUUCAGC AAUCCCAGUG	25
2951	UGUUUUGGAC CGAGGGAAAC GCCCCGCCGC GCAUGUCCAU ACCGUUUUUG	
3001	AGCAUUGGCA ACGCCUAUUC AAAUUUCUAU GACGGAUGGU CUGAAUUUUC	
3051	CAGGAACGGA GUUUACGGCA UCAACACGGC AAACAACAUG GGCACGCUA	30
3101	AUGCAAGACA UGUCAACGCU GGAAGCACGG GUCCAAUAAA AAGCACCAUU	
3151	AGAAUCUACU UCAAACCGAA GCAUGUAAA GCGUGGUAAC CUAGACCACC	
3201	UAGACUCUGC CAAUACGAGA AGGCAAAGAA CGUGAACUUC CAACCCAGCG	35
3251	GAGUUACCAC UACUAGGCAA AGCAUCACUA CAAUGACAAA UACGGCGCA	
3301	UUJUGACAAC AAUCAGGGGC AGUGUAUGUG GGGAACUACA GGGUGGUAAA	40
3351	UAGACAUCAU GCUACCAGUG CUGACUGGCA AAACUGUGUG UGGGAAAGUU	
3401	ACAACAGAGA CCUCUUAGUG AGCACCGACCA CAGCACAUUG AUGUGAUUU	
3451	AUAGCCAGAU GUCAGUGGCAC AACGGGAGUG UACUUUUGUG CGUCCAAAAAA	45
3501	CAAGCACUAC CCAAUUUCGU UUGAAGGACC AGGUCUAGUA GAGGUCCAAG	
3551	AGAGUGAAUA CUACCCAGG AGAUACCAAU CCCAUGUGCU UUUAGCAGCU	50

10. Rekombinante DNA nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Nukleotide 6059 bis 7130 der Sequenz von Anspruch 7 enthält.

6059	UC AAGGCCAAUU UUGAAGAGGC UAUAUUUUCC AAGUUAUAG	55
6101	GAAAUGUCAA CACACACGGUG GAUGAGUACA UGCUGGAAGC AGUGGACCAC	
6151	UACGGCAGGCC AACUAGCCAC CCUAGUAUC AGCACUGAAC CAAUGAAACU	60

6201 GGAGGACGCA GUGUACGGUA CCGAGGGUCU UGAGGCGCUU GAUCUAACAA
 6251 CGAGUGCCGG UUACCCAUAU GUUGGCACUGG GUAUCAAGAA GAGGGACAU
 5 6301 CUCUCUAAGA AGACUAAGGA CCUAACAAAG UUAAAGGAAU GUAUGGACAA
 6351 GUAUGGCCUG ACCUACCAA UGGUGACUUA UGUAAAAGAU GAGCUCAGGU
 10 6401 CCAUAGAGAA GGUAGCGAAA GGAAAGUCUA GGCUGAUUGA GGCGUCCAGU
 6451 UUGAAUGAUU CAGUGGGCAU GAGACAGACA UUUGGUAAUC UGUACAAAAC
 15 6501 UUUCCACCUA AACCCAGGGG UUGUGACUGG UAGUGCUGUU GGGUGUGACC
 6551 CAGACCUCUU UUGGAGCAAG AUACCAGUGA UGUUAGAUGG ACAUCUCAUA
 20 6601 GCAUUJUGAUU ACUCUGGGUA CGAUGCUAGC UUAAGCCCUG UCUGGUUUGC
 6651 UUGCCUAAAA AUGUUACUUG AGAACGUUGG AUACACGCAC AAAGAGACAA
 6701 ACUACAUUGA CUACUUGUGC AACUCCCAUC ACCUGUACAG GGAUAAAACAU
 25 6751 UACUUJUGUGA GGGGUGGCAU GCCCUCGGGA UGUUCUGGUA CCAGUAUUU
 6801 CAACUCAAUG AUUAACAAUA UCAUAAUUAUG GACACUAAUG CUAAAAGUGU
 6851 ACAAAAGGGAU UGACUUGGAC CAAUUCAGGA UGAUCGCAUA UGGUGAUGAU
 30 6901 GUGAUCGCAU CGUACCCAUG GCCUAAUAGAU GCAUCUUUAC UCGCUGAAGC
 6951 UGGUAAGGGU UACGGGCUGA UCAUGACACC AGCAGAUAGG GGAGAGUGCU
 7001 UUAACGAAGU UACCUGGACC AACGCCACUU UCCUAAAGAG GUAUUUUAGA
 7051 GCAGAUGAAC AGUACCCUJ CCUGGUGCAU CCUGUUAUGC CCAUGAAAGA
 7101 CAUACACGAA UCAAUUAGAU GGACCAAGGA

35 11. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er eine rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 6 bis 10 enthält.

40 12. E. coli VP4/2/3, DSM 5558.

13. E. coli, VP1.

14. E. coli 3D^{Pol}.

45 15. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man es aus einem Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 11 bis 14 nach Aufschluß der Zellen gewinnt oder eine rekombinante DNA nach einem der Ansprüche 6 bis 10 in geeignete Wirtszellen einbringt und das Polypeptid aus dem Kulturmedium, gegebenenfalls nach Aufschluß der Zellen, gewinnt.

50 16. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 5, vorzugsweise einem der Ansprüche 2 bis 4 zur Erzeugung von gruppenspezifisch polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern gegen Enteroviren.

55 17. Gruppenspezifischer immunologischer Nachweis von Enterovirus-Infektionen durch Untersuchung von Blut oder Serum von Patienten, dadurch gekennzeichnet, daß man in einem an sich bekannten immunologischen Test mindestens eines der Polypeptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Antigen zum Nachweis von Antikörpern gegen Enteroviren oder nach Anspruch 16 erzeugte Antikörper zum Nachweis von Virus-spezifischen Antigenen einsetzt.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

Aufbau des **direkten ELISA** für den Enterovirus-spezifischen Antigenenachweis bzw. für den Antikörpernachweis

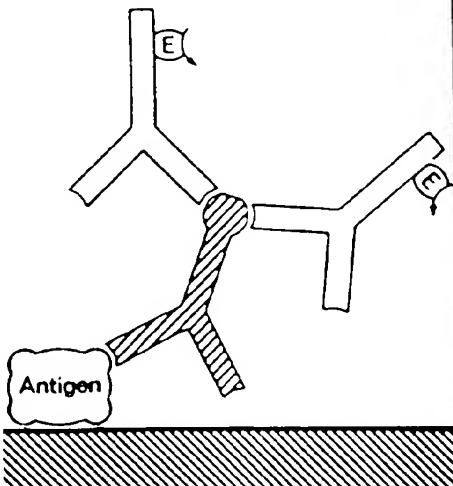
Antigen Nachweis	Antikörper-Nachweis	
Enzymkonjugat zum Nachweis von humanem Immunglobulin	Enzymkonjugat zum Nachweis von humanem Immunglobulin	
polyklonales Antiserum (aVP4/2/3, aVP1 oder a3D ^{P+1})	polyklonales Antiserum (aVP4/2/3, aVP1 oder a3D ^{P+1})	
gebundenes Antigen aus Patientenserum	gebundenes Antigen aus Patientenserum	
Festphase	Festphase	

Fig. 2

Aufbau eines 'Sandwich' ELISA für den Enterovirus-spezifischen Antikörpernachweis

